

MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE TOXINAS E ALÉRGENOS DE MAMONA E DE PINHÃO-MANSO

Por: Olga Lima Tavares Machado, professora da Universidade Estadual do Norte Fluminense

O óleo de mamona e de pinhão-manso são usados para diversos fins industriais, incluindo a produção de biodiesel. No entanto, as sementes destas oleaginosas contêm compostos tóxicos e alergênicos. Os componentes alergênicos também estão presentes no pólen destas oleaginosas, constituindo riscos não só para os que maipulam a torta como também para pessoas que residem próximas ao plantio dessas oleaginosas. Assim, é importante desenvolver métodos para detectar e controlar a dispersão destes alérgenos no ar. A utilização da torta de ambos, pinhão-manso e mamona, é, portanto, totalmente dependente de metodologias precisas e padronizadas para determinar a atividade tóxica e alergênica presente nesses coprodutos. Neste contexto, apresentamos um resumo de métodos existentes usados para a detecção de atividades tóxicas e alergênicas, das tortas das oleaginosas em análise.

Os compostos tóxicos encontrados nas sementes de mamona e também na torta são: a proteína ricina (toxalbumina) e o alcalóide volátil ricinina e uma fração alergênica que se trata de um conjunto de glicoproteínas denominado CB-1A - Castor-bean allergen. No pinhão-manso devemos os componentes tóxicos são os ésteres de forbol e a proteína curcina. O único alérgeno identificado até

o momento é a proteína denominada Jat c 1, presente nas sementes e no pólen.

A escolha dos métodos de identificação e quantificação pode estar focada na detecção do componente tóxico ou pode envolver a determinação da atividade biológica, tóxica, dessa molécula. Os métodos físicos e fisico-químicos demonstram a presença da molécula, mas não a atividade biológica. Entre eles podemos citar a análise eletrofotrética, a determinação por espectrometria de massas e técnicas imunológicas. A identificação da ricina por eletroforese vem sendo empregada por diversos pesquisadores, é simples e rápida. Ela serve como um primeiro rastreamento para investigar a

Foto: Leonardo Ferreira

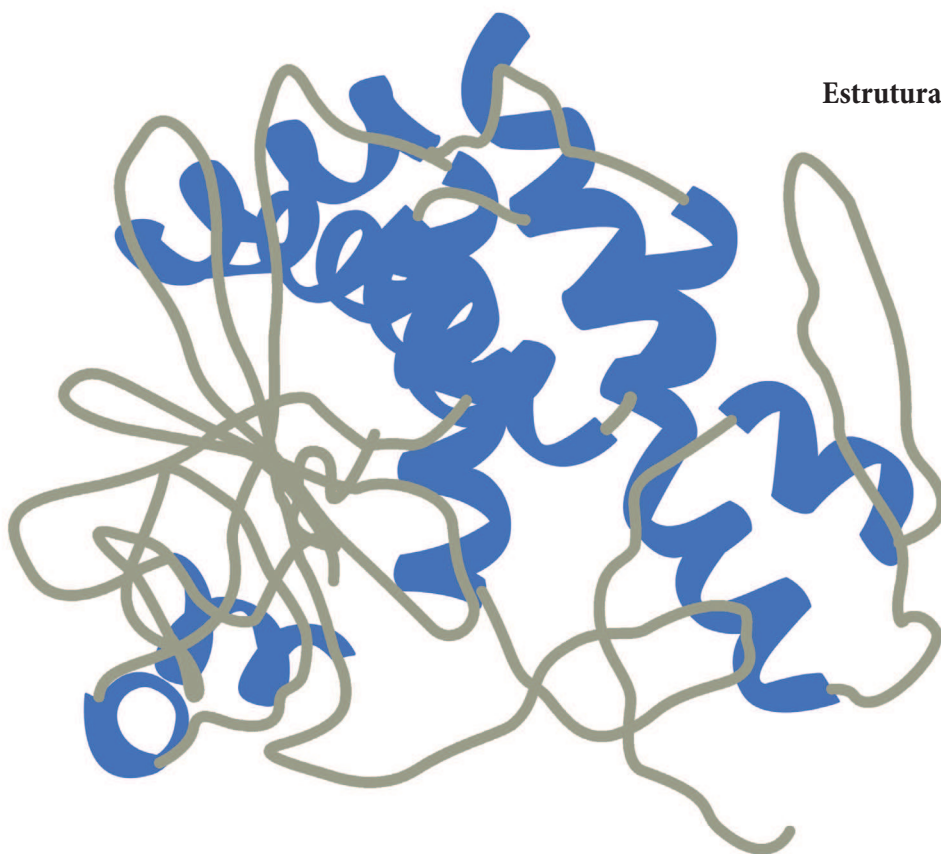


presença de ricina e a sua possível degradação por diversos processos de destoxificação. Esta técnica pode ser empregada também para a identificação da curcina. Um outro método físico-químico é a detecção dos componentes tóxicos, ricina, curcina e esteres de forbol por espectrometria de massas. Comumente esta metodologia utiliza uma das duas abordagens: detecção de proteína intacta ou o mapeamento dos peptídeos gerados após hidrólise com a enzima tripsina.

Um dos métodos mais antigos que foi empregado para a detecção da ricina foi o ensaio imunoenzimático (ELISA). Neste ensaio utiliza-se um anticorpo que reconhece a proteína ricina. Após revelações específicas é possível identificar e quantificar a proteína tóxica (ricina ou curcina).

Detecção da atividade tóxica por curcina e por ricina:

- **Inibição da síntese proteica** - Ricina e curcina são proteínas tóxicas porque inibem a síntese proteica (RIP), contribuindo para a morte celular. Assim, o primeiro método para a detecção de actividade ricina baseou-se na medição da inibição da síntese proteica em um sistema de célula de reticulócitos de coelho.
- **Atividade enzimática** - A inibição da síntese proteica provocada pela ricina e pela curcina ocorre pois estas proteínas catalisam reações de depurinação, ou seja a remoção de um resíduo de adenina do RNA ribossomal. Existem diversos trabalhos que associam a depurinação com a inibição da síntese proteica, tendo como



Estrutura da curcina

◆ Pesquisa

consequência a morte celular. Assim, a determinação da atividade enzimática poderia refletir a atividade tóxica da ricina. Como substrato para a curcina e ricina fragmentos de RNA ou de DNA (aptâmeros) foram construídos. A atividade enzimática de depurinação, pode então ser medida pelo decréscimo na concentração do aptâmero ou pela quantificação da adenina liberada.

- **Viabilidade celular** - A fim de aprimorar os métodos de detecção da atividade biológica da ricina foi proposto o uso de células Vero, uma linhagem celular derivada de rins de macaco (*Chlorocebus sabaeus*), com algumas características de células epiteliais para avaliar a toxicidade provocada pela ricina. Neste ensaio, os autores avaliaram a morfologia das células antes e após a incubação com ricina, e a atividade da enzima lactato desidrogenase (LDH) citoplasmática, liberada para o meio extracelular em função da morte celular. As células mortas são identificadas por visualização e microscópio ótico.

Identificação de atividades tóxicas provocadas por ésteres de forbol

A determinação da atividade irritante causada por ésteres de forbol foi demonstrada pela primeira vez em 1984, em orelhas de rato.

O método mais comumente usado para detectar e quantificar EF é a cromatografia líquida de alta eficiência com separação em fase reversa (RP-HPLC). Este método foi padronizado para detectar EF em diferentes acessos de pinhão-manso. Foi através deste método que a ausência dos ésteres de forbol foi detectada em um acesso não tóxico, as sementes do acesso mexicano Papantla.

Semelhante aos métodos de detecção de ricina e curcina, a atividade biológica de ésteres de forbol deve ser testada para garantir a eficiência dos processos de destoxificação da torta de pinhão-manso. A avaliação dos processos de destoxificação tem sido feita frequentemente em animais vivos, tais como ratos, ovinos, porcos e peixes. Além do teste de atividade tóxica dos EF contra lesmas hospedeiras, a susceptibilidade do parasita *Schistosoma mansoni* foi também ensaiada. Os crustáceos *Artemia salina* e *Daphnia magna* são também utilizados como indicadores de toxicidade aos EF.

Detecção da atividade alergênicas provocadas por mamona e por pinhão-manso

Sementes e pólen de mamoneira e de pinhão-manso apresentam proteínas alergênicas pertencentes à classe das albuminas 2S. Os principais alérgenos de *Ricinus communis* são denominados Ric c 1 e Ric c 3, e o único isolado, até o momento, de *Jatropha curcas* é denominado Jat c 1. Todos estes alérgenos são proteínas heterodiméricas com massa molecular entre 10 e 14 kDa. Possuem duas cadeias polipeptídicas, unidas por pontes de enxofre. A atividade alergênica destas albuminas 2S é resistente à desnaturação térmica e química, podendo, mesmo após alguns tratamentos de destoxificação, desencadear alergia por contato bem como por inalação.

Existem diversos ensaios para a detecção dos alérgenos que avaliam somente a interação destes com IgE específica, usando ensaios imunoenzimáticos (ELISA). Estes ensaios não avaliam a desgranulação celular mediada por IgE e, deste modo, podem demonstrar resultados falso positivos, ou seja, avalia-se somente a ligação entre o alérgeno e a IgE,

sendo caracterizado como ensaio de reconhecimento antígeno-anticorpo, não correspondendo aos eventos biológicos de transdução de sinal e, consequente liberação dos grânulos observados nos mastócitos ou basófilos

Ensaio de desgranulação de mastócitos ou de basófilos

Neste ensaio, mastócitos isolados da cavidade peritoneal de ratos são empregados para avaliação da alergenicidade. Basófilos sanguíneos, obtidos diretamente de soros ou provenientes de culturas de células podem também ser empregados. Para avaliar a resposta biológica estas células devem ser inicialmente incubadas/armadas com 5 μ L de soro anti-albumina 2S contendo IgEs específica. A seguir, são incubadas com o alérgeno e com solução de 0,1% de azul de toluidina, 10% de formaldeído e 1% de ácido acético, para evidenciar a desgranulação. A contagem diferencial das células, íntegras e desgranuladas é feita, em câmara de Neubauer, usando microscópio óptico. A Figura abaixo ilustra mastócitos íntegros e mastócitos desgranulados observados após o contato com alérgenos de mamona. ◆

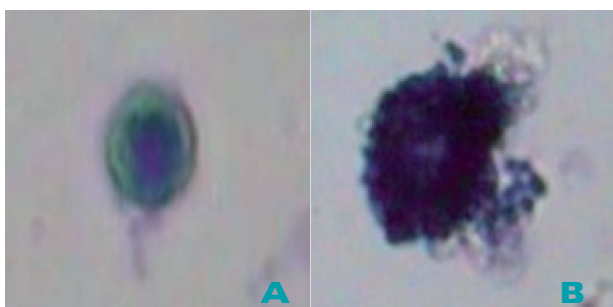


Figura A – Fotos obtidas por Microscopia ótica: A - Mastócitos íntegros; B- Mastócitos desgranulados. Ambos corados com azul de toluidina.



Foto: Arquivo Pessoal

Olga Lima Tavares Machado

Possui graduação em Química, mestrado e doutorado em Bioquímica e pós-doutorado na Universidade Federal do Rio de Janeiro. Atualmente é professora titular da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

